

VU Research Portal

Genetic Control of Meristem Identity in Petunia

Kusters, E.

2011

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Kusters, E. (2011). *Genetic Control of Meristem Identity in Petunia*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

7

Nederlandse samenvatting

Elske Kusters



Samenvatting van het proefschrift

Genetische Controle van Meristeemidentiteit in Petunia

Veel lezers van dit proefschrift zullen niet bekend zijn met de wereld van de moleculaire biologie en botanie. Daarom beschrijf ik het onderzoek in dit proefschrift in deze samenvatting in woorden en termen die ook te volgen zijn voor leken. Soms zal ik daarvoor wat kort door de bocht gaan, maar de mensen die daar om malen, verwijst ik vriendelijk naar de eerdere hoofdstukken in dit proefschrift.

Petunia en Arabidopsis

De titel van dit proefschrift (in het Nederlands vertaald) is ‘Genetische Controle van Meristeemidentiteit in Petunia’. Laat ik beginnen bij het laatste woord.

Petunia. In mijn omgeving was het organisme waar ik jarenlang mee werkte vaak onderwerp van hilariteit. Men had het over begonia’s of over geraniums, en het bloedserieuze congres ‘de Wereld Petunia Dagen’ kon ik bijna niet noemen zonder -al dan niet stiekem- uitgelachen te worden. Hoe onterecht! Het onderzoek dat ik deed was leuk en spannend, en dat ik met petunia werkte was een belangrijk onderdeel daarvan.

Wat onderzoek doen aan petunia bijzonder maakt, is dat het overgrote deel van de onderzoekers die met planten werken *niet* met petunia aan de slag is. Het populairste plantje onder onderzoekers is het onkruidje ‘*Arabidopsis*’, in het Nederlands ‘zandraketje’ genoemd. De kans dat je *Arabidopsis* kent, is volgens mij kleiner dan dat je petunia kent, omdat petunia ook een sierplant is die menig balkon en perk siert, en dus niet alleen bekend als modelorganisme voor onderzoek.

Genen en eiwitten

Als je onderzoek doet naar DNA en naar de manier waarop dat DNA wordt doorgegeven aan het nageslacht, noemt men dat erfelijkheidsleer of ‘genetica’. Het woord genetica komt van *genesis* dat ‘oorsprong’ betekent. Genetica bevat ook het woord ‘gen’. Een gen is een stukje DNA dat het recept is voor het maken van een eiwit.

Eiwitten op hun beurt zijn de ‘werkers’ in de cellen van organismen. Sommige eiwitten laten bijvoorbeeld, vaak heel specifiek, stoffen de cel in of uit. Andere

eiwitten zorgen er weer voor dat de ene stof wordt omgezet in een andere, bijvoorbeeld om de cel van energie te voorzien. Een bijzonder soort eiwit is een ‘transcriptiefactor’. Dat is een eiwit dat ervoor zorgt dat andere genen aan en uit gaan. Transcriptiefactoren zorgen er dus voor dat andere eiwitten (niet meer) gemaakt worden, en zijn daardoor een soort managers van de andere werkers.

Omdat een gen een recept is voor het maken van een eiwit, resulteert een fout in een gen in het maken van een eiwit met een fout. Soms wordt er zelfs helemaal geen eiwit meer gemaakt. Hoewel niet elke mutatie invloed heeft, kan één enkele mutatie ervoor zorgen dat een organisme niet meer levensvatbaar is. Vaak gaat er echter iets mis in de ontwikkeling van een cel of van een groep cellen, waardoor een organisme er anders uit gaat zien. Het fenotype -het uiterlijk, het geheel van door ons waarneembare eigenschappen van een organisme- is dan anders en we noemen het organisme een ‘mutant’.

Één van de bijzondere kenmerken van petunia’s is dat ze actieve transposons hebben. Transposons zijn springende stukjes DNA die soms ook in een gen kunnen springen. Als dat gebeurt gaat het gen stuk en krijg je een mutant. Doordat petunia’s deze transposons van nature hebben, komen er op een natuurlijke manier veel mutanten voor in petunia.

Alle organismen hebben genen, en de manier waarop er eiwitten van worden gemaakt is overal hetzelfde, of in ieder geval heel vergelijkbaar. De basisprincipes van de genetica zijn daardoor universeel voor alle soorten, van bacterie tot plant tot mens.

Ontwikkeling en evolutie

Maar waarom heb ik nu aan planten onderzoek gedaan, en niet aan muizen of mensen? Bij de bevruchting bestaat elk organisme uit één enkele eicel. Bij alle diersoorten vormt zich uit deze ene eicel, die schijnbaar zonder voor- of achterkant is, een organisme met een kop en een staart. Nadat bepaald is waar de kop en de staart komen, wordt het verdere ‘bouwplan’ van een organisme bepaald. Met het bouwplan bedoel ik de fundamentele lichaamsbouw van een organisme, de manier waarop de organen aan het lichaam zitten. Bij veel dieren bestaat het bouwplan uit een romp met daaraan een kop, een staart en vier ledematen. Bij planten voltrekt zich een vergelijkbaar ontwikkelingsproces: na de bevruchting vormt zich uit één eicel een plantje met een wortel en een embryonaal steeltje en blaadjes, dus een plantje met een boven- en onderkant. Maar in tegenstelling tot bij dieren vormt een plant zijn verdere bouwplan pas na de ‘geboorte’.

Hoe een bouwplan genetisch bepaald wordt, daar is nog relatief weinig over bekend. Om dit te bestuderen kun je twee soorten met verschillende bouwplannen met elkaar vergelijken. De evolutietheorie gaat ervan uit dat verschillende soorten ontstaan doordat in een individu genen gemuteerd raken. Als dit gemuteerd gen zorgt voor een ander fenotype dat gunstig is voor de overlevingskansen van het individu, blijft de mutatie behouden. Zo accumuleren zich in de loop van de generaties in een deel van de populatie steeds meer verschillen, totdat je spreekt van een andere soort. Deze soort heeft dan bijvoorbeeld een ander bouwplan. Als je het DNA van deze soort vergelijkt met dat van de oorspronkelijke soort, zul je de cruciale mutaties vinden in de genen die verantwoordelijk zijn voor de vorming van het bouwplan.

In de dierenwereld vind je verschillende bouwplannen in soorten die zó anders zijn dat je moet gaan zoeken in een woud van verschillen, waardoor de genetische verschillen die verantwoordelijk zijn voor het bouwplan niet meer makkelijk te vinden zijn. In de plantenwereld bestaan echter soorten die evolutionair gezien relatief dicht bij elkaar staan, maar toch een fundamenteel ander bouwplan hebben. Deze verschillen zijn het grootst in het deel van de plant dat de bloemen draagt. Afgezien van allerlei ethische bezwaren is het dus zinvoller om de bouwplannen van planten te vergelijken, dan om naar deze fundamentele kennis op zoek te gaan in dieren.

Een andere aanpak om deze genen te vinden, is zoeken naar individuen met een mutant bouwplan binnen een soort. Vergelijk dit met het stuk maken van de antenne van een radio: als je de antenne weghaalt, dan leer je waar hij oorspronkelijk voor diende. In petunia helpen de transposons je hierbij een handje. Je zet een kas vol petunia's -denk hierbij aan duizenden plantjes- waarin de transposons vrolijk rond springen. Deze springen af en toe in een gen dat verantwoordelijk is voor het maken van het bouwplan, en het plantje waarin dit gebeurt zal een ander bouwplan hebben dan alle andere, waardoor je hem kunt selecteren. Vervolgens ga je in zijn DNA op zoek naar dat ene transposon, en daar omheen vind je het gen dat gewoonlijk voor het juiste bouwplan zorgt.

Bouwplannen en meristemen

Planten vormen hun bouwplan dus na de geboorte, en in tegenstelling tot dieren maken ze hun hele leven nieuwe organen. Voor deze processen zijn de 'meristemen' van de plant verantwoordelijk. Dit zijn de groeipunten, groepjes stamcellen, nog-niet-gespecialiseerde cellen, die in de toppen van planten zitten.

Voordat hij gaat bloeien heeft een plant één meristeem in de top. In jonge planten, net na de kieming, genereert dit meristeem alleen bladeren. Op een zeker moment voltrekt zich een dramatische verandering in het meristeem, waardoor het overschakelt van de productie van bladeren naar de productie van bloemen. Voor de toeschouwer is dit ook een opwindend moment, want “hij bloeit!”. Het moment van bloeien wordt gemarkeerd door het verschijnen van een tweede meristeem aan de zijkant van het eerste meristeem. Daarna wordt elk meristeem óf een bloem, óf er vormt zich nogmaals een nieuw meristeem aan de zijkant, zonder dat er een bloem gemaakt wordt. Welk lot de meristemen dan beschoren is, wordt bepaald door welke genen erin aan of uit gaan. Sommige genen geven een meristeem de opdracht zich te ontwikkelen tot een bloem, terwijl andere de bloemvorming juist remmen en zorgen voor de vorming van een nieuw meristeem, en dus een scheut. Zo bepalen genen het bouwplan van een plant. ‘Genetische Controle van Meristeemidentiteit’ in de titel van dit proefschrift duidt dus op het bloemvormende of niet-bloemvormende karakter van de meristemen als gevolg van de invloed van bloem-stimulerende en bloem-remmende genen.

In Figuur 1A van Hoofdstuk 4 zie je schematisch drie verschillende bouwplannen van planten getekend. De ‘raceme’ is het bouwplan zoals *Arabidopsis* dat heeft: een aar. Een aar groeit recht naar boven (het pijltje) en maakt bloemen aan de zijkant (de rode bollen). In de aar wordt in het meristeem in de top bloemvorming continu geremd en het blijft steeds nieuwe meristemen aan de zijkant maken die wel bloemen worden. De ‘cyme’ is het bouwplan van petunia: een tros, zoals je vast kent van de trostomaat. In een tros wordt het meristeem in de top een bloem en wordt de groei voortgezet uit het nieuwe meristeem aan de zijkant. Dit meristeem vormt eerst een volgend meristeem en wordt daarna ook een bloem, enzovoort.

Wij hebben geprobeerd het ontstaan van verschillende bouwplannen te begrijpen door op zoek te gaan naar de genen die de bouwplannen bepalen, en deze genen van petunia te vergelijken met die van *Arabidopsis*.

De resultaten

Hoofdstuk 1 van dit proefschrift is een inleiding die kort samenvat wat de belangrijkste resultaten in elk hoofdstuk zijn en hoe deze resultaten samenhangen.

Hoofdstuk 2 gaat over het *LEAFY* gen. *LEAFY* is een belangrijk bloem-stimulerend gen uit *Arabidopsis* en een gen van het ‘manager type’. Petunia heeft (vrijwel) hetzelfde gen, dat hier *ALF* heet. In dit hoofdstuk beschrijven we wat naar ons

idee de evolutionaire herkomst is van het *LEAFY* gen, en wat wij denken dat het *LEAFY* eiwit in de evolutionaire oertijd deed, toen planten die bloemen maken nog niet bestonden, maar het *LEAFY* gen al wel. Dit hoofdstuk is een samenvatting van resultaten uit bestaande literatuur.

LEAFY en zijn petuniavariant *ALF* gebruiken allebei een partner voor het geven van bloem-identiteit aan meristemen. Deze partners zijn net als *LEAFY* en *ALF* dezelfde genen, maar in een andere soort. In petunia kan *ALF* geen bloemidentiteit geven zonder deze partner, *DOT*, en *DOT* niet zonder *ALF*. In *Arabidopsis* lijkt *LEAFY* wat minder afhankelijk van de partner, die daar *UFO* heet. In beide soorten vormen de bloemen zich echter wel steeds op de plaats waar de twee eiwitten *samen* aanwezig zijn. In de aar *Arabidopsis* zijn *LEAFY* en *UFO* samen actief in de nieuwe meristemen aan de zijkant, terwijl in de tros petunia *ALF* en *DOT* in het meristeem in de top actief zijn.

De plek waar een gen aan staat, wordt bepaald door een stuk DNA dat de 'promoter' heet. De promoter is het DNA vlak voor het recept voor het eiwit in een gen, en hij werkt als een soort aan/uit schakelaar. De schakelaar wordt bediend door de manager-eiwitten, transcriptiefactoren. Voor **Hoofdstuk 3** zochten we uit of *ALF* en *LEAFY*, en *DOT* en *UFO* op andere plaatsen aan staan omdat hun promotors anders zijn en dus onder controle staan van andere transcriptiefactoren, of dat ze worden aan- en uitgezet door dezelfde transcriptiefactoren, maar dat die in deze twee soorten op een andere plaats actief zijn. Hiervoor gebruikten we een genetische truc: we zetten de promotors van de vier genen voor een gen dat een blauwe kleurstof kan maken en maakten genetisch gemodificeerde petunia's en *Arabidoppes* met deze kunstmatige promoter-gen combinaties. Door de blauwe kleur konden we zien hoe een petunia-promoter zich gedraagt in *Arabidopsis*, en andersom.

Wat bleek, is dat *DOT* en *UFO* op een andere plaats aan staan doordat de promotors van *DOT* en van *UFO* heel veel van elkaar verschillen. Ze staan onder controle van heel andere transcriptiefactoren, die in andere meristemen aanwezig zijn. In tegenstelling gedragen de promotors van *ALF* en *LEAFY* zich hetzelfde als ze in dezelfde soort zitten, en ze staan dus waarschijnlijk onder controle van dezelfde transcriptiefactoren. Dat *ALF* en *LEAFY* op een ander meristeem actief zijn in petunia en *Arabidopsis*, komt doordat hun managers in deze soorten een ander meristeem werken. Hiermee laten we zien dat verschillen in bouwplannen niet alleen door veranderingen in genen, maar ook door veranderingen in promotoren veroorzaakt kunnen worden.

Hoofdstuk 4 gaat over *EXTRAPETALS (EXP)*. *EXP* is, in tegenstelling tot *ALF*, een bloem-remmend gen in petunia. *EXP* zorgt ervoor dat het nieuwe meristeem dat aan

de zijkant ontstaat niet meteen bloem wordt, maar eerst nog een nieuw meristeem vormt. Is *EXP* gemuteerd, dan valt deze remming weg en wordt het nieuwe meristeem te snel een bloem. Vervolgens wordt dit meristeem opgenomen in de bloem in de top, waardoor een *exp* mutant geen tros maakt, maar slechts één enkele bloem, zoals bijvoorbeeld een tulp. *EXP* is dus onmisbaar voor het maken van het tros-bouwplan.

Dat een dergelijk remmechanisme in trossen zou bestaan werd al vermoed, maar was nog nooit aangetoond. *Arabidopsis* remt namelijk ook bloemvorming, in de top, maar gebruikt hiervoor andere genen. Verrassend genoeg blijkt de *EXP* van *Arabidopsis* niet betrokken bij het maken van het bouwplan van *Arabidopsis*, maar zorgt hij daar met een vergelijkbaar remmechanisme voor het correct vormen van alle organen de bloemen.

Zonder *ALF* en *DOT* kan petunia geen om bloemen maken, maar ook de *evergreen* mutant is bloemloos. *ALF* en *EVERGREEN* zijn beide transcriptiefactoren, en *DOT* is de rechterhand van *ALF*. Met het onderzoek dat in **Hoofdstuk 5** beschreven is hebben we gezocht naar de genen die onder controle staan van *ALF* en *DOT*, en *EVERGREEN*.

Tot onze verrassing blijkt dat een belangrijke taak van *EVERGREEN* het aanzetten *DOT* is. Dit verbaasde ons omdat *EVERGREEN* actief is in het meristeem aan de zijkant, dus in het meristeem waar petunia niet direct een bloem maakt en waar *DOT* ook niet actief is. *EVERGREEN* moet *DOT* dus op een indirecte manier aansturen. Verder blijkt dat *ALF* en *DOT* samen een stel genen aanzet dat al bekend is uit eerder onderzoek. Terwijl *ALF* en *DOT* de eerste aanzet geven voor het maken van een bloem, zijn deze genen juist bij het laatste deel van dat proces betrokken. Er zitten dus niet nog verschillende lagen managers tussen, maar het maken van een petuniabloem lijkt in een relatief niet-hiërarchische organisatie te gebeuren.

Hoofdstuk 6 gaat over de petuniaversie van het *Arabidopsis* gen *APETALA1*. ‘a-petala’ betekent ‘zonder petalen’, zonder bloemblaadjes dus. Als een *Arabidopsis* mutant is voor dit gen maakt hij bloemen zonder bloemblaadjes, maar ook maakt hij de overgang naar bloemen maken pas laat. Als je *APETALA1* met een genetische truc vroeg in het leven van *Arabidopsis* activeert, krijgt het plantje juist al heel vroeg bloemen en wordt het meristeem in de top ook een bloem.

Omdat *APETALA1* een belangrijk gen is voor het bouwplan van *Arabidopsis*, zochten we naar het gen in petunia dat het meest op *APETALA1* lijkt. Dit gen heet *PIE07*. Het muteren van *PIE07* heeft geen enkele invloed op petunia, en ook het vroeg aanzetten

van *PIE07*, of van *APETALA1*, versnelt het bloemen maken in petunia niet. Dit is vreemd, omdat het vroeg aanzetten van *PIE07* in *Arabidopsis* het bloeien wél versnelt en er dus niks 'mis' lijkt te zijn met *PIE07*. Deze resultaten zijn een aanwijzing dat het maken van bloemen in petunia en *Arabidopsis* niet alleen in andere meristemen, maar ook deels met andere genen geregeld wordt.

Ten slotte

Fundamenteel onderzoek aan petunia geeft ons inzicht in hoe een bouwplan wordt gevormd. De resultaten kunnen op korte termijn van belang zijn bij de teelt van belangrijke landbouwgewassen zoals tomaat, paprika, aardappel of tabak. De planten in de nachtschadefamilie zijn namelijk evolutionair gezien directe broertjes en zusjes van petunia, waardoor hun genen tot in extreme mate hetzelfde zijn. Waar bloemen komen, vormen zich later vruchten, dus informatie over de genen die het bouwplan beïnvloeden kan bijvoorbeeld gebruikt worden om de oogst te verbeteren. Zoals je hierboven hebt kunnen lezen heeft petunia dus een stuk meer te bieden dan mooie kleurige bloemen voor op het balkon alleen.